D. Kostrek
1889
H. Burchard

Beiträge

zur

Kenntniss der Cholesterine.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

der

medicinischen Facultät der Universität zu Rostock

vorgelegt

von

Hans Burchard

aus Rostock,

prakt. Arzt und Assistent am pathologischen Institut.

BIBLIOTHEEK RIJKS UNIV. LEIDEN

Rostock.

Universitäts-Buchdruckerei von Adler's Erben.

1889.

Nachdem man aus den Gallensteinen zuerst das Cholesterin dargestellt hatte, gelang es auch sehr bald, dasselbe in verschiedenen Geweben des Thierkörpers nachzuweisen. Man bestimmte seine Zusammensetzung auf $C_{25}H_{41}.OH$, erkannte, dass es ein einatomiger Alkohol sei, und stellte auch einige Esterverbindungen des Körpers dar; auch erwies es sich (Zwenger[1]), dass das Cholesterin durch concentrierte Schwefelsäure in drei isomere Kohlenwasserstoffe zerlegt wurde, die man Cholesteriline nannte. 1876 machte Walitzky[2]) darauf aufmerksam, dass das Cholesterin in seinen Derivaten manche Analogie mit den Terpenen zeige. Neuerdings hat Weyl[3]) darauf hingewiesen, das Zwenger's Cholesteriline wahrscheinlich Terpene sind. Zu einer Vorstellung über die Lagerung der Atome im Cholesterin-Molekül kam man nicht.

Physiologisch wurde die Bedeutung des Körpers nicht eingehend behandelt; man bezeichnete ihn als Gallenfett und begnügte sich damit, ihn als Hauptbestandtheil der am häufigsten vorkommenden Gallensteine erkannt zu haben. Durch Benecke's[4]) Untersuchungen, welche lehrten, dass auch in Pflanzensaamen Cholesterin vorkomme, wurde ein

[1]) Annal. d. Chemie u. Pharm. Bd. 66, S. 5. 1848.
[2]) Berl. Berichte. Bd. XI. 1311. 1876.
[3]) Arch. f. Anat. u. Phys. — Phys. Abth. 1886. S. 182.
[4]) Annal d. Chem. u. Pharm. Bd. 122, S. 249. 1862.

weiterer Gesichtspunkt für die Beurtheilung des Cholesterins im physiologischen Sinne geschaffen. Lindenmeier[1]) untersuchte dann 1863 das quantitative Verhalten des Cholesterins bei reifen und unreifen Saamen.

Neuere Untersuchungen zeigten, dass das von Benecke gefundene Pflanzencholesterin wahrscheinlich nicht identisch sei mit dem Gallencholesterin. Es wurde von Hesse[2]) das Phytosterin aus der Calabarbohne, von Schulze und Barbieri[3]) das Caulosterin aus den Wurzeln der Lupine dargestellt. Ausserdem wurden noch aus dem Wollfett das Isocholesterin von E. Schulze[4]) und von H. Reinke und Rodewald[5]) das Paracholesterin aus Aethalium septicum gewonnen. Man kennt also heute an Stelle des früher allein bekannten Gallencholesterins eine Reihe von Körpern, die alle in ausserordentlich naher Verwandschaft zu einander stehen und daher berechtigter Weise mit dem Familien-Namen: Cholesterine bezeichnet werden können. Sie alle verhalten sich den gewöhnlichen Lösungsmitteln gegenüber gleich; ihre Lösungen drehen den polarisierten Lichtstrahl nach links mit alleiniger Ausnahme des Isocholesterins, und alle geben, wieder mit Ausnahme des Isocholesterins, die bekannte Reaktion mit Chloroform und Schwefelsäure. Die Elementaranalysen der Cholesterine stimmen alle so ziemlich auf die Formel $C_{26}H_{43}.OH$. Hesse[6]) nimmt allerdings eine homologe Reihe an indem er das Atom-

[1]) Lindenmeier: Beiträge zur Kenntniss des Cholesterins. Tübingen 1863.

[2]) Annal. der Chem. u. Pharm. Bd. 192, S. 175. 1878.

[3]) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 25, S. 159. 1882.

[4]) Berl. Berichte. Bd. VI. 251. 270. 1873.

[5]) Annal. der Chem. u. Pharm. Bd. 207, S. 229. 1881.

[6]) Annal. der Chem. u. Pharm. Bd. 91, S. 175. 1872.

gewicht des Cholesterins auf $C_{25} H_{41} . OH$ und dasjenige des Phytosterins als nächst höheren Homologon auf $C_{26} H_{43} . OH$ bestimmt. Geführt wurde Hesse zu dieser Anschauung durch das verschieden starke Drehungsvermögen beider Körper; da das Cholesterin den polarisierten Lichtstrahl stärker nach links dreht, weist er ihm den nächst niedrigeren Platz an. Reinke und Rodewald[1]) halten jedoch dieses Argument nicht für schwerwiegend genug, um die bisher angenommene Isomerie der Cholesterine als widerlegt anzusehen, obgleich sie zugeben, dass die Elementaranalyse auch bei ihrem Paracholesterin nicht im Stande ist zu entscheiden, ob dasselbe ein wirkliches Isomeres des Cholesterins oder nur ein Glied einer homologen Reihe der Cholesterine ist.

1885 legte Liebermann[2]) die Beziehungen eines von Giesel aufgefundenen Begleiters des Chinovins, den er zuerst „Oxychinoterpen", dann „Cholestol" nannte, zu dem Cholesterin klar. Bei der Gelegenheit entdeckte er eine Reaktion, die in derselben Weise, wie seinem Cholestol, dem Cholesterin zukommt. Liebermann fand, dass Lösungen des Cholesterins in Essigsäureanhydrid unter Abkühlung mit concentrierter Schwefelsäure tropfenweise versetzt sich zuerst rosenroth färbten, dass diese Färbung jedoch bald einer beständigen Blaufärbung Platz machte. Er nahm dabei soviel Cholesterin als in der Kälte noch eben gelöst blieb.

Mit dieser Reaction der „Cholestol-Reaction" habe ich mich zunächst nun etwas näher beschäftigt. Ich benutzte bei meinen Versuchen gereinigtes Cholesterin aus Gallensteinen.

---

[1]) Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. 207, S. 229. 1881.
[2]) Berl. Berichte. Bd. XVIII, S. 1803. 1885.

Es galt, zu untersuchen, wie sich die Reaction gestalten würde, wenn man kleinere Mengen Cholesterin nähme. Dabei stellte es sich heraus, dass mit Abnahme der Concentration der Cholesterinlösung der blaue Farbenton allmälig in einen blaugrünen und schliesslich in einen rein grünen Farbenton überging, und ferner, dass diese grüne Färbung sehr viel beständiger war als die blaue. In ganz verdünnten Lösungen war der Eintritt der Rothfärbung nicht mehr zu constatieren, auch war von einer Blaufärbung kaum mehr die Rede, sondern erst nach geraumer Zeit, etwa 3—5 Minuten, trat die Grünfärbung auf.

Weiterhin untersuchte ich, ob es nöthig sei, eine Lösung des Cholesterins in Essigsäureanhydrid anzuwenden, oder ob auch beim Zusatz von Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure zu einer Lösung von Cholesterin in Chloroform die Cholestol-Reaction anstatt der gewöhnlichen Schwefelsäure-Chloroform-Reaction erhalten würde. Zu diesem Zweck setzte ich zu Cholesterin-Chloroformlösungen wechselnde kleine Mengen Anhydrid und einen bis zwei Tropfen Schwefelsäure; wenn nicht zu geringe Mengen Essigsäureanhydrid genommen waren, trat stets die Cholestol-Reaction in der oben beschriebenen Weise auf. Späterhin habe ich die geringste nöthige Menge Anhydrid, die noch eine scharfe gleichmässige Reaction ermöglicht, festgestellt. Das Nähere hierüber ist weiter unten mitgetheilt.

Hieran schloss sich die Frage: Kann man statt des Chloroforms irgend ein anderes Lösungsmittel anwenden? Es wurden in dieser Beziehung untersucht:

Amylchlorid,	Toluol,
Methylenchlorid,	Xylol,
Aethylenchlorid,	Petrolaether,
Acetylchlorid,	Amylen,
Chlorbenzol,	Aether,
Chlortoluol,	Buttersäure.
Benzol,	

Das Resultat war ein positives; nothwendig ist nur, dass das Lösungsmittel wasserfrei ist, weil Wasser die Wirkung des Anhydrides abschwächt. Beim Aether war dies besonders in die Augen fallend, er musste erst durch Chlorcalcium wasserfrei gemacht werden, dann gelang aber auch hier die Reaction.

Nebenbei sei bemerkt, dass auch bei der alten Cholesterin-Reaction mit Schwefelsäure und Chloroform das letztere durch einige der genannten Lösungsmittel ersetzt werden kann, nämlich durch Benzol, Chlorbenzol, Chlortoluol, Methylenchlorid und Aethylenchlorid. Ausser dem Lösungsmittel bleibt auch die Schwefelsäure purpurroth gefärbt bei Anwendung von Amylchlorid, während in Toluol, Xylol und Amylen Nichts mehr von den durch die Schwefelsäure gebildeten Cholesterilinen übergeht. Aether Petrolei endlich, sowie Buttersäure lassen sich für diese Reaction gar nicht verwenden.

Offenbar war es weiter von Interesse zu erfahren, ob andere Säure-Anhydride dieselbe Wirkung hervorbrachten wie das Essigsäureanhydrid. Es wurden, um dies zu entscheiden, Chloroformlösungen versetzt mit:

Phtalsäureanhydrid,
Isobuttersäureanhydrid,
Benzoësäureanhydrid.

Das Resultat war auch hier ein durchaus positives.

Es liegt auf der Hand, dass auch umgekehrt Cholesterin und Schwefelsäure, jenes zuerst mit dem zu prüfenden Körper gemischt und je nach Bedürfniss mit Chloroform versetzt, hierauf die Schwefelsäure vorsichtig zugefügt, als Reagenz auf Säure-Anhydride verwendet werden können. Dass dabei Wasser stets vollständig vermieden werden muss, geht aus dem Früheren hervor.

Mit Absicht ist stets das Wort Säure-Anhydride gebraucht worden, denn die sogenannten Ester-Anhydride sind, wie wir gestützt auf Versuche mit Cumarin glauben sagen zu dürfen, nicht im Stand das Essigsäureanhydrid u. s. w. zu ersetzen. Noch weniger wird man das von den sogenannten Anhydridsäuren erwarten dürfen.

Endlich suchte ich an Stelle der concentrierten Schwefelsäure, concentrierte Phosphorsäure, gewonnen aus Phosphorsäureanhydrid, das eine Zeit an der Luft gestanden hatte, zu verwenden. Das ging jedoch nicht, es gelang nur die gewöhnliche, durch concentrierte Schwefelsäure entstehende Rothfärbung zu erzielen, niemals die Cholestolfärbung.

Bei der grossen Schärfe, die diese Reaction auf Cholesterin hat, musste es mit Leichtigkeit gelingen, dasselbe in Chloroformextracten aus thierischen Organen nachzuweisen. Man konnte also untersuchen, ob in allen Organen des Thierkörpers durchgehends Cholesterin oder cholesterinartige Körper vorhanden seien. Zu dem Zwecke wurden Stücke von Organen eines Frosches über Schwefelsäure getrocknet in einem Reagenzrohr mit Chloroform übergossen und etwa eine Stunde damit stehen gelassen. Die abgegossene Chloroformlösung wurde dann

mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure versetzt. Es wurden untersucht:

Muskel,	Leber,
Herzmuskel,	Haut,
Eierstock,	Bauchfell.
Eileiter,	

In allen diesen Organen wurde das Vorhandensein von Cholesterin mit Leichtigkeit constatiert. Die Erwägung, dass die Blutkörperchen Cholesterin enthalten [1]), liess obigen Beweis für Vorhandensein des Cholesterins als ungenügend erscheinen. Es wurde daher in einem Kaninchen durch 0,6 % Kochsalzlösung, auf Körpertemperatur erwärmt, die gesammte Blutmenge ersetzt, indem in eine vena jugularis vermittelst einer Kanüle die Lösung eingelassen und zuerst eine vena femoralis, dann die andere, schliesslich die vena cava inferior vor dem Eintritt in den rechten Vorhof eröffnet wurde. Sobald die ablaufende Flüssigkeit keine Rothfärbung mehr zeigte, wurden Stücke aus allen Organen des Kaninchens entnommen und auf Glasplatten über Schwefelsäure zum Trocknen aufgestellt.

Die Untersuchung auf den Cholesteringehalt geschah in derselben Weise, wie bei den Organen des Frosches. Dieselbe erstreckte sich auf:

Leber,	Milz,
Niere,	Nebennieren,
Pankreas,	Linsen,
Speicheldrüsen,	Knochenmark,
Magendrüsen,	Unterhautfett,
Eierstöcke,	Nierenfett,
Muskel,	Knorpel.
Herz,	

[1]) Hoppe-Seyler, Physiol. Chemie. Berlin 1881. S. 81.

Das Resultat war auch hier das gleiche, wie beim Frosch: nirgends wurde Cholesterin vermisst. Bemerkenswerth war, dass das Unterhautfett und Nierenfett durch schwächste Reaktion den geringsten Cholesteringehalt anzeigten.

Die einfache Methode des Nachweises des Cholesterins benutzte ich nun noch weiter. So untersuchte ich einige wirbellose Thiere: Hummel, Tausendfuss, Schnecke und Regenwurm. Dieselben wurden mit etwas Sand zerrieben, getrocknet und mit Chloroform übergossen. Bei allen diesen Thieren war das Resultat ein positives.

Hiermit habe ich die Beobachtungsreihe abgebrochen; die Thatsache, dass man in allen Thieren und Theilen derselben, sobald man genau prüft, Cholesterin findet, erlaubt wohl schon als in hohem Grade wahrscheinlich hinzustellen den Satz: Cholesterin ist ein regelmässiger und also wohl auch wesentlicher Bestandtheil des Protoplasmas. Der Satz musste an Wahrscheinlichkeit noch gewinnen, wenn auch in der Pflanzenwelt, deren Protoplasma von dem der Thiere nicht verschieden ist, überall Cholesterin oder genauer gesagt eine Cholesterinart gefunden wurde.

So habe ich denn Pflanzensaamen auf das Vorkommen von Cholesterin-Reaction gebenden Körpern untersucht. Die Saamen wurden im Mörser zerstossen und mit Chloroform übergossen, die abgegossene Lösung in bekannter Weise geprüft. Direct positives Resultat wurde erhalten bei:

Calabarbohnen,	weissem Senf,
Mandeln,	schwarzem Senf,
grünen Erbsen,	Hanf,
gelben Erbsen,	Bohnen,
Reis,	Roggen,

Weizen,	Kastanie,
Gerste,	Orangenkern,
Leinsaamen,	Apfelkern,
Mohnsaamen,	Kornradesaamen.
Haselnuss,	

Negatives Resultat erhielt ich beim Kaffee und bei der Paranuss. Das Chloroformextract aus dem Kaffee wurde nach Zusatz von Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure blutroth; die Lösung gab einen Absorptionsstreifen zwischen den Linien D und E. Bei der Paranuss trat ebenfalls rothe Farbe auf, in der Lösung war jedoch kein Absorptionsstreifen zu sehen. Nach der Verseifung des Aetherextract aus Kaffeebohnen mit alkoholischer Kalilauge gelang es, die Cholestolreaction zu erhalten. Bei der Paranuss kam ich auch so nicht zum Ziel.

Von anderen Pflanzentheilen untersuchte ich: Rhabarberwurzel, Orangenschaale, Orangenfruchtfleisch mit direct positivem Erfolge.

Von chlorophyllfreien Pflanzen benutzte ich zur Untersuchung: Champignon, Aspergillus glaucus, Bierhefe, und konnte auch hier ohne Mühe mit Hülfe der Cholestol-Reaction die Anwesenheit des Cholesterins nachweisen. Für die Hefe war das nur die Bestätigung der Angabe von Hoppe-Seyler.[1])

Die zahlreichen, im Vorstehenden mitgetheilten Beobachtungen im Verein mit den bereits in der Literatur vorliegenden, stützen nun wohl den oben S. 10 aufgestellten Satz über das Vorkommen des Cholesterins so genügend, wie überhaupt ein solcher Satz gestützt werden kann, nämlich bis dahin, dass ein Fall von lebensfähigem Protoplasma ohne cholesterinartige Substanz sicher constatirt ist. Die

[1]) Hoppe-Seyler, Physiol. Chemie. Berlin 1881. S. 81.

Beobachtung an der Paranuss würde ich noch nicht als einen solchen Fall gelten lassen; hier ist wahrscheinlich das Eintreten der Reaction durch irgend eine Substanz gehindert, deren Entfernung uns (im Gegensatz zu den Kaffeebohnen) nicht gelingen wollte.

Mit Absicht wird gesagt „eine cholesterinartige Substanz"; wie weit die verschiedenen Cholesterine sich durch die Cholestol-Reaction nachweisen lassen und so dieser Reaction ein allgemeinerer Werth zukommt, darüber ist an dieser Stelle noch Einiges nachzutragen. Zunächst sei bemerkt, dass die Reaction im Chloroformextract der Calabarbohne, also bei Phytosterin, sich nicht wesentlich anders verhielt, wie beim gewöhnlichen Cholesterin, nur dass der Farbenton ein mehr gelbgrüner im Gegensatz zum blaugrünen bei dem gewöhnlichen Cholesterin war.

Weiter das Isocholesterin angehend, so habe ich dessen Muttersubstanz und das daraus in der von Schulze und Barbieri angegebenen Weise dargestellte Isocholesterin selbst untersucht. Zuerst wurde etwas von dem Lanolin in Chloroform gelöst und mit dieser Lösung die Reaction angestellt. Es trat eine sehr starke Reaction ein, die Flüssigkeit war tiefdunkelgrün und fluorescierte stark. Darauf wurden 100 gr. Lanolin mit alkoholischer Kalilauge verseift, die durch Umkrystallisieren aus heissem Alkohol gewonnenen Krystalle im zugeschmolzenen Glasrohr mit Benzoesäureanhydrid erhitzt, der Isocholesterinbenzoesäureester von Cholesterinester getrennt und zum Schluss Isocholesterin durch Verseifung rein gewonnen. Dasselbe zeigte die nadelförmigen Krystalle, hatte allerdings einen zwei Grad niedrigeren Schmelzpunkt, als von Schulze angegeben, schien jedoch für den vorliegenden Ver-

such genügend rein. Es wurde mit einer kleinen Portion die Reaction angestellt. Die Flüssigkeit färbte sich dunkelgrün, und starkes Fluorescieren trat auch jetzt auf, das selbst bei ziemlich erheblicher Verdünnung noch erkennbar blieb. So ist also nachgewiesen, dass dem Isocholesterin zwar eine Farbenreaction mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure zukommt, dieselbe sich jedoch wesentlich von der dem gewöhnlichen Cholesterin zukommenden unterscheidet.

Bei der grossen Schärfe, die die Liebermann-sche Reaction hat, so dass man noch sehr geringe Mengen Cholesterin erkennen kann, schien es nicht unmöglich, dass man auf colorimetrischem Wege zu genaueren quantitativen Resultaten kommen könne, als man bisher erhalten hat, um so etwas mehr Einblick in die Bedeutung des Cholesterins im thierischen und pflanzlichen Organismus zu erhalten.

Man ist bisher bei der quantitativen Bestimmung des Cholesteringehalts in der Weise verfahren, dass man die Aetherextracte derjenigen Substanzen, deren Cholesteringehalt man quantitativ bestimmen wollte, verseifte, die Seife wiederum mit Aether extrahierte, den Aether abdestillierte, den Rückstand in der Wärme in wenig absolutem Alkohol löste und die nach dem Erkalten ausgeschiedenen Krystalle auf einem Filter sammelte, trocknete und wog. Die durch solche Bestimmungen erhaltenen Zahlen können, wie Schulze und Barbieri[1]) auch selbst sagen, auf Genauigkeit keinen Anspruch machen. Ich bezweifele aber auch, ob sie überhaupt untereinander vergleichbar sind. Es werden doch durch

[1]) a. o. a. O.

den Aether aus der verseiften Substanz nicht nur Cholesterine extrahiert, sondern ebensowohl auch etwas von den gebildeten Seifen, die ja durchaus nicht ganz unlöslich in Aether sind. Je nachdem nun mehr oder weniger Seifen in den zweiten Aetherextract gelangen, werden dieselben, im Alkohol in der Kälte gelöst, eine alkoholische Seifenlösung hervorbringen, die ihrerseits wiederum Cholesterin nach dem Grade ihrer Concentration in Lösung zu halten vermag. Hoppe-Seyler [1]) giebt zur Trennung der Seife vom Cholesterin folgendes Verfahren an: Das Cholesterin wird mit sammt den Seifen im Wasser zertheilt, die Seifen durch Salzsäure zerlegt, Fettsäuren und das Cholesterin durch Schütteln mit Aether aus dem Wasser entfernt, der Aether wird abgehoben. Jetzt wird zur Entfernung der Fettsäuren die Aetherlösung mit sehr verdünnter Natronlauge geschüttelt, die Lauge abgelassen, wieder Wasser zugesetzt und nun nochmals geschüttelt. Es befindet sich dann das Cholesterin in der ätherischen, die Natronseifen der fetten Säuren in der wässerigen Lösung. Offenbar ist aber auch dieses Verfahren nicht ganz brauchbar zur quantitativen Bestimmung, da das Cholesterin zwar zum grössten Theil in den Aether geht, zum Theil jedoch auch in der Seifenlösung enthalten sein kann, und umgekehrt wieder Seifen in den Aether gehen können. Ausserdem ist die wässerige Seifenlösung schwer genau von der Aetherlösung des Cholesterins zu trennen.

Um nun die colorimetrischen Bestimmungen beginnen zu können, musste erst festgestellt werden, wie viel Essigsäureanhydrid und wie viel Schwefel-

---

[1]) Hoppe-Seyler, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. 5 Auflage. 1883. S. 168.

säure nöthig war, um die Reaction am stärksten und zugleich auch am beständigsten auftreten zu lassen. Es wurde zu dem Zweck zuerst aus Gallensteinen gewonnenes Cholesterin durch Umkrystallisieren aus heissem Alkohol gereinigt. Sodann wog ich 0,05 gr. Cholesterin und löste dasselbe in 100 cbcm. Chloroform. Eine so verdünnte Lösung wurde angewendet, weil bei stärkerer Concentration die Farbenunterschiede zu gering werden. Von dieser Cholesterinlösung wurden je 2 cbcm. mit der Saugpipette herausgenommen und in sechs gleich weite Reagenzrohre eingelassen und mit 1, 2, 4, 6, 8 und 10 Tropfen Essigsäureanhydrid und je einem Tropfen Schwefelsäure versetzt. Nach einer viertel Stunde war die Reaction mit 10 Tropfen Essigsäureanhydrid am stärksten eingetreten. Darauf machte ich denselben Versuch, mit 10 Tropfen beginnend, weiter mit 10, 12, 14, 16, 18, 20 Tropfen Essigsäureanhydrid. Die Reaction blieb sich jetzt vollkommen gleich. Für 2 cbcm. war also als nöthige Menge 10 cbcm. erprobt. Schwefelsäure hatte ich bisher nur einen Tropfen genommen. Auch in dieser Beziehung machte ich eine Versuchsreihe von 1 bis 6 Tropfen Schwefelsäure ansteigend. Hier ergab es sich, dass mit zunehmender Menge der Schwefelsäure zwar die Reaction schneller eintrat, aber auch schneller verging; während mit einem Tropfen Schwefelsäure die Färbung über eine Stunde sich ganz gleich blieb, verschwand sie bei sechs Tropfen schon nach einer halben Stunde. Also war die passende Menge concentrierte Schwefelsäure ein Tropfen.

Jetzt konnte man leicht von einer Chloroformlösung feststellen, ob sie mehr oder weniger Cholesterin enthalte als irgend eine bekannte Lösung und zwar durch die Stärke der Reaction, die eintrat,

wenn man 2 cbcm. der bekannten Lösung und 2 cbcm. der zu untersuchenden mit je 10 Tropfen Essigsäureanhydrid und einem Tropfen concentrierter Schwefelsäure versetzte.

Um genauer noch den Gehalt zu bestimmen, musste eine Farbenskala hergestellt werden. Zu dem Ende wurden noch 1,8, 1,6, 1,4, 1,2, 1,0, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 cbcm. der Cholesterin-Chloroformlösung herausgenommen und in gleich weite Reagenzrohre gebracht, dann alle auf 2 cbcm. mit reinem Chloroform aufgefüllt. Darauf wurde mit allen die Reaction angestellt. Zum Vergleich waren von Herrn Professor Nasse zwei Lösungen hergestellt, die eine 0,035 % die andere 0,02 % Cholesterin enthaltend, mit denen in gleicher Weise verfahren wurde. Nach einer viertel Stunde Stehen gelang es mit Leichtigkeit, die beiden mir unbekannten, zu bestimmenden Lösungen einzureihen. Auf diese Weise hatte ich den Cholesteringehalt auf $^1/_{10}$ Milligramm genau bestimmt.

Hiernach schien es also möglich, so lange es sich um Gallenstein-Cholesterin handelte, den Cholesteringehalt der Substanzen auf colorimetrischem Wege quantitativ zu bestimmen. Man brauchte nur die Aetherextracte aus gewogenen Mengen getrockneter Substanz im Chloroform zu lösen, die Lösung auf ein bestimmtes Volumen zu bringen, mit 2 cbcm. dieser Lösung die Reaction anzustellen und jetzt in die Farbenskala irgend einer bekannten Cholesterinlösung einzureihen.

Zu einem Anfangsversuch wählte ich die Leber, nicht allein, weil dieselbe, so viel wir wissen, nur das Gallenstein-Cholesterin enthält, sondern auch, weil sie mir geeignet erschien, falls die Methode sich bewährte, zu weiteren Untersuchungen. Konnte ein Durchschnittswerth für den Cholesteringehalt der

Leber einer bestimmten Thierart festgestellt werden, so liess sich mit diesem vergleichen der Gehalt in verschiedenen Lebensperioden, in Krankheitszuständen u. dgl. m.

Eine gewogene Quantität Leber eines Hundes, dessen Blut in derselben Weise, wie oben vom Kaninchen beschrieben, durch 0,6 % Kochsalzlösung ersetzt worden war, trocknete ich im Schwefelsäureexsiccator, nachdem ich, um Faulen zu verhindern, etwas Benzoesäure hinzugesetzt hatte. Die trockene Masse wurde jetzt nochmals gewogen, um auch die Trockensubstanz berechnen zu können, dann in den Extractionsapparat von Soxleth gebracht und mit Aether extrahiert. Nach Verjagen des Aethers nahm ich den Rückstand mit Chloroform auf und brachte die Lösung im Messkölbchen auf 50 cbcm. Leider zeigte sich aber, wie schon der Aetherextract, nun auch die Chloroformlösung stark gefärbt, so dass ein Vergleichen mit der Normallösung unmöglich erschien. So musste ich auf die quantitative colorimetrische Bestimmung in thierischen Organen verzichten.

Bei den Chloroformauszügen aus Pflanzensaamen hatte ich die Erfahrung gemacht, dass dieselben fast ganz ungefärbt waren. Ich beschloss daher noch einen Versuch mit der Bestimmung des Cholesteringehaltes der Saamen zu machen.

Zu dem Zwecke zählte ich 50 Gerstkörner ab, trocknete dieselben auf dem Wasserbade und schliesslich im Exsiccator über Schwefelsäure. Darauf verfuhr ich ebenso wie mit der Hundeleber. Wider Erwarten zeigte sich aber die Chloroformlösung doch gelblich gefärbt. Die Farbstoffe waren wohl hauptsächlich durch das früher nicht angewendete Trocknen auf dem Wasserbade gebildet worden. In Folge dessen liess sich die Lösung nach eingetretener

Reaction nicht in die Farbenskala einrangiren, da die gelbe Farbe durch den Zusatz von Essigsäureanhydrid und concentrierter Schwefelsäure nicht zum Verschwinden gebracht werden konnte und der gelbgrüne Farbenton, der so zu Stande kam, eine Vergleichung mit dem blaugrünen Farbenton der Cholesterinlösungen unmöglich machte. Ein Versuch, gefärbte Normallösung durch Färben mit durch Hitze gebräuntem Fibrin herzustellen, wurde aufgegeben, wie sich herausstellte, dass die aus den Saamen in der oben angegebenen Weise gewonnenen Lösungen von letzterer verschieden gefärbt waren.

So ist denn die Cholestol-Reaction wohl ein überaus brauchbares Mittel, um die Cholesterine auch in sehr erheblichen Verdünnungen nachzuweisen und aufzufinden, zu genauen quantitativen Resultaten zu verhelfen, die uns wichtige Aufschlüsse geben könnten über die Stellung des Cholesterins im Haushalte des Organismus, ist sie aber leider nicht im Stande. Man wird also neue Mittel und Wege suchen müssen, das Cholesterin in geeigneterer Weise von den mit ihm zu gleicher Zeit vorkommenden Seifen etc. zu trennen, um so genauere quantitative Bestimmungen zu erzielen.

Wir kommen jetzt zu einer Reihe von Versuchen, die uns über die Bildung des Cholesterins Aufschluss geben sollten. Oben hatten wir gezeigt, dass Cholesterin eine Substanz ist, die überall, wo sie gesucht wird, auch gefunden wird, dass sie also ein steter Begleiter des Protoplasmas zu sein scheint. Hierdurch ist natürlich vollständig ausgeschlossen, dass das Cholesterin, wie man wohl geglaubt hat (J. Munk [1]), im Thierkörper allein gebildet wird.

[1]) Encyclop. d. Med. 3. Aufl. Bd. IV 256. 1885.

Im Allgemeinen gehen die Ansichten der Forscher bis jetzt dahin, dass das Cholesterin ein Spaltungsproduct des Eiweisses sei.[1]) Diese Ansicht stützt sich einerseits darauf, dass man dasselbe dort reichlicher findet, wo Eiweiss zerfallen ist, z. B. bei der fettigen Metamorphose der Gewebe, andererseits auf Schulze's und Barbieri's quantitative Untersuchungen an Lupinensaamen, etiolierten Keimlingen und grünen Pflänzchen. Die genannten Forscher machten in allerdings, meiner Ansicht nach, unvollkommener Weise es wahrscheinlich, dass sich das Cholesterin beim Keimen im Dunklen vermehre, beim Keimen im Licht dagegen vermindere. Die Vermehrung dachten sie sich durch Spaltung entstanden, und nahmen diese Entstehungsweise ganz besonders für das „Caulosterin" in Anspruch, da es neben den gewöhnlichen Spaltungsproducten des Eiweisses vorkomme. Die Verminderung des Cholesterins beim Keimen im Licht wollen Schulze und Barbieri durch den Verbrauch zu irgend welchen Stoffbildungen erklären. Eine Deutung dieser Verminderung und der Verwendung zu Stoffbildungen dürfte wohl durch die kürzlich erschienene Arbeit von Hansen[2]) möglich geworden sein. Der genannte Forscher hat nämlich durch Lichteinwirkung aus dem gelben Chlorophyllfarbstoff eine krystallisierende Substanz dargestellt, die mit Chloroform und Schwefelsäure die Cholesterin-Reaction giebt, also jedenfalls einen zur Cholesteringruppe gehörigen Körper erhalten.

Bei der Annahme, dass das Cholesterin ein Spal-

[1]) Hoppe-Seyler, Handb. d. physiol. und pathol.-chem. Analyse, 81. 1883.

[2]) Hansen: „Die Farbstoffe des Chlorophyll". Darmstadt 1889.

tungsproduct, und zwar des Eiweisses sei, da es in etiolierten Keimlingen neben den Amidosäuren etc. vorkommt, schien es möglich, dasselbe vielleicht auch extra corpus aus dem Eiweiss zu erhalten. Wir haben nun eine Reihe Versuche angestellt, die uns hierüber Aufschluss geben könnten.

Als Ausgangsmaterial wurde zu diesem Zweck eine grössere Menge getrockneten, gereinigten Hühner-Eiweisses im Extractionsapparat mit Aether behandelt und so von allem anhaftenden Cholesterin befreit. Hierauf wurden kleinere Portionen desselben durch Erhitzen mit verschiedenen Agentien zersetzt. Es ist angewendet worden:

Salzsäure,	Kalilauge.
Essigsäure,	Barythydrat.

Um die Essigsäure zur Wirkung zu bringen, ist Eiweiss mit derselben in Röhren eingeschmolzen worden, welche längere Zeit im Wasserbade erhitzt wurden.

Die entstandenen Massen wurden schliesslich neutralisiert, eingedampft, unter Zusatz von Sand weiter getrocknet und pulverisiert und endlich unter dem Exsiccator zum vollkommenen Trocknen aufgestellt. Hierauf wurden sie mit Aether extrahiert. Die Extraction geschah auch hier, wie späterhin, immer im Extractionsapparat von Soxleth. Der Rückstand war nach Abdestillieren des Aethers nur von geringer Quantität und bräunlichem Aussehen, leicht löslich in Chloroform. Mit den Chloroformlösungen wurde sodann die Cholestol-Reaction angestellt. Dieselbe ergab in allen vier Fällen negatives Resultat. Da Cholesterin durch keines der angewendeten Agentien unter den Bedingungen, unter welchen diese zur Anwendung gekommen sind, zersetzt wird, ist mit Bestimmtheit zu sagen, dass keine cholesterinartige Substanz entstanden ist.

In einem weiteren Versuche unternahm ich es, die Abspaltung aus Eiweiss durch Pankreasferment (Trypsin) zu bewirken. Hier musste, um das Experiment beweisend zu machen, das verwendete Ferment ebenso wie das Albumen vom anhaftenden Cholesterin befreit sein. Ich habe übrigens nicht reines Trypsin, sondern das ganze Pankreas (vom Hunde) verwendet, das bei niederer Temperatur sehr vorsichtig und rasch getrocknet und dann mit Aether im Soxleth-Apparat behandelt war. Dann wurde Eiweiss und Pankreas in einen Kolben mit Wasser gebracht, etwas kohlensaures Natron bis zur deutlichen alkalischen Reaction zugesetzt und der Kolben in einem Wasserbade bei Körpertemperatur aufgehängt. Zur Verhütung von Mitwirkung von Fäulnissorganismen war eine Quantität Chloroform hinzugesetzt. Die Wirksamkeit des Fermentes zeigte sich in der bald auftretenden Biuret-Reaction. Nach 24 Stunden wurde die ganze Masse in eine Abdampfschale gebracht und eingedampft. Mit einem Theil der nach dem Eindampfen erhaltenen Masse wurde wie oben verfahren. Das Ausbleiben der Cholestol-Reaction zeigte jedoch auch hier die Abwesenheit von Cholesterinen an.

Einen letzten Versuch, ähnlich den älteren Versuchen über Fettbildung, stellte ich jetzt an. Ich wollte untersuchen, ob aus cholesterinfreiem Fibrin durch Fäulniss sich Cholesterin bilden könne. Das Fibrin, das ich zu diesem Versuch nahm, war ein schon seit langer Zeit im Institut in Glycerin aufbewahrtes Präparat und erschien durch Lichteinwirkung leicht gelb gefärbt. Es ward gekocht, vom Glycerin durch längeres Auswaschen befreit, dann getrocknet und mit Aether extrahiert, darauf in der Reibschale zerrieben. In einer flachen Glasschale wurde das

Fibrin mit einer Nährlösung übergossen und nachdem eine Spur fauliger Substanz, welche, in eben so geringer Menge geprüft, Cholesterin-Reaction nicht gab, hinzugefügt war, stehen gelassen. Von Zeit zu Zeit goss ich etwas von der Nährlösung, die aus veraschter Bierhefe hergestellt war, nach, um so das Fibrin feucht zu erhalten. Dasselbe ging sehr bald in Fäulniss über. Nach drei Wochen stellte ich die faulende Masse, die sich dunkelbraun gefärbt hatte, im Exsiccator über Schwefelsäure auf. Mit dem nach dem Trocknen im Soxleth'schen Apparat gewonnenen Aetherextract, welcher nach Abdestillieren des Aethers wie bei allen vorigen Versuchen in Chloroform gelöst wurde, wurde die Cholestol-Reaction angestellt und ergab hier ein durchaus positives Resultat.

Dieser Versuch ist freilich durchaus nicht einwandsfrei und durchaus nicht beweisend für die Entstehung des Cholesterins durch Spaltung des Eiweisses. Es finden ja in den Organismen nicht bloss Spaltungen statt, sondern auch Synthesen, und grade die einfachsten Organismen, wie die zu diesem Versuche verwendeten, besitzen im hohen Maasse die Fähigkeit, aus einfachen organischen Molekülen die complicierten Moleküle des Eiweisses, Fettes, der Kohlehydrate zu bilden. So werden wir denn auch die Bildung des Cholesterins ganz allgemein als auf analytischen und synthetischen Prozessen beruhend ansehen müssen und die Auffassung des Cholesterins als eines Spaltungsproductes des Eiweisses um so mehr zurückweisen, als auch noch andere Gründe gegen dieselbe sprechen. Wir finden solche mit Drechsel[1]) in der Natur des Eiweissmoleküls, das

[1]) Handwörterbuch der Chemie. Bd. 3, S. 543. 1885.

wie auch Pflüger[1]) meint, ursprünglich „keine Radicale mit mehr als C_6 oder C_9“ enthält.

Meine nächste Untersuchung richtete sich nun darauf, ob sich im thierischen Organismus überhaupt Cholesterin bilde oder ob die zweifellos eintretende Vermehrung beim Wachsen des Individuums durch Aufnahme von Pflanzencholesterin bewirkt werde. Zu dem Ende beabsichtigte ich den Cholesteringehalt von Fliegeneiern und von Fliegenmaden zu vergleichen und zwar mit Hülfe der Cholestol-Reaction. Eine gleiche Anzahl Eier und Maden sollten getrocknet, mit Aether extrahiert, mit gleichen Mengen Chloroform aufgenommen und mit 2 cbcm. der Lösung die Reaction angestellt werden.

Als Nahrung für die Maden nahm ich eine Portion von dem oben schon benutzten entfetteten Fibrin. Dasselbe wurde mit Leitungswasser angesetzt und mit den Eiern besäet.

Nach 1 bis 2 Tagen krochen die Maden aus. Augenscheinlich konnten sie aber das so hergestellte Nährmaterial nicht bewältigen, denn sie gingen in kurzer Zeit zu Grunde. Bei einem weiteren Versuch wurde etwas getrocknetes, entfettetes Hühnereiweiss in Wasser gelöst und hinzugefügt. Die jetzt auskriechenden Maden ernährten sich sehr gut. Es war jedoch ein anderer Uebelstand hinzugetreten: Das Nährmaterial fing nämlich an zu faulen, es wurde also aus dem cholesterinfreien ein cholesterinhaltiges Nährmaterial. So konnte der Versuch nichts mehr beweisen und wurde daher aufgegeben.

Ich habe oben ausgeführt, durch welchen Uebelstand mir die genaue, quantitative Bestimmung des

[1]) Archiv f. d. gesammt. Physiol. Bd. 42, S. 151. 1888.

Cholesterins auf colorimetrischem Wege unmöglich gemacht wurde. Ferner habe ich gezeigt, wie die quantitativen Bestimmungen von Schulze und Barbieri durchaus ungenau sein müssen. Da nun auf so ungenaue quantitative Bestimmung hin die Ansicht von der Herkunft des Cholesterins aus dem Eiweissmolekül fusst, ich aber durch meine Untersuchungen keinen Anhalt für diese Ansicht finden konnte, schien es mir thunlich, die Resultate der Bestimmungen von Schulze und Barbieri auf ihre Richtigkeit zu prüfen, und zwar mit Hülfe der Cholestol-Reaction. Wenn man nämlich gleiche Mengen ungekeimte und im Dunkeln gekeimte Samen trocknete, mit Aether extrahierte, den Aetherextract mit gleichen Mengen Chloroform aufnahm und dann mit 2 cbcm. die Reaction in gleicher Weise anstellte, so musste bei eingetretener Vermehrung des Cholesterins bei den etiolierten Keimlingen dies leicht durch ein stärkeres Auftreten der Reaction zu erkennen sein.

Ich habe zu diesen Versuchen Linsen und Grassaamen verwandt. Der grösseren Genauigkeit wegen stellte ich Parallelversuche an.

Ausgesuchte, in Grösse und Farbe möglichst gleiche Linsen wurden auf dem Wasserbade getrocknet und darauf unter den Exsiccator gestellt. Nach 3 Tagen wurden sie in einer Reibschale zerstossen, und die zerstossenen Samen sodann mit Hülfe eines Platinlöffels in eine Filterpapierdüte gebracht. Der in der Reibschale haftende Rest wurde mit trocknem Filtrirpapier herausgewischt, die Papierstückchen ebenfalls in die Düte geworfen. Jetzt extrahierte ich die Samen und löste dann, nach Abdestillieren des Aethers, die lufttrockenen Extracte in Chloroform. Die Lösung wurde in einen Maasskolben

von 50 cbcm. gebracht, sodann mit Chloroform nachgespült bis der Messstrich erreicht war. Den Messkolben verschloss ich mit einem Korkstöpsel, schüttelte um und entleerte die Lösung in eine Flasche mit gut schliessendem Glasstöpsel. Von beiden Lösungen nahm ich mit kleinen graduierten Saugpipetten Flüssigkeit heraus und liess je 2 cbcm. in Glasröhrchen von gleicher Weite ein. Sodann wurde zu jedem der beiden Flüssigkeitsproben 10 Tropfen Essigsäureanhydrid und 1 Tropfen concentrierte Schwefelsäure hinzugesetzt. Nach einer Stunde war die Reaction bei beiden gleich stark aufgetreten. Die Methode erwies sich also als brauchbar.

In derselben Weise verfuhr ich mit 7 Tage alten etiolierten Linsen-Keimlingen. Die Linsen waren einen Tag in Wasser gequollen und hatten sodann 6 Tage im Dunkeln an einem warmen Orte gestanden. Schon bei der Vergleichung der Keimlings-Lösungen untereinander fiel es auf, dass die Reaction einen mehr gelben Farbenton zeigte als bei den ungekeimten Saamen. Im Uebrigen war auch bei diesem Parallelversuch gleich starke Färbung aufgetreten. Bei der Vergleichung jedoch mit den ungekeimten ergab sich, dass das Gegentheil von dem nach den Angaben von Schulze und Babieri zu Erwartenden eintrat. Die Grünfärbung war bei den Saamen deutlich stärker, wie bei den Keimlingen.

Von den Grassaamen hatte ich je dreihundert abgezählt, die Aetherextracte in nur 25 cbcm. gelöst und zur Vergleichung 14 Tage alte im Dunkeln gebildete Keimlinge genommen, sonst war das Verfahren das gleiche, wie bei den Linsen.

Hier waren eigenthümlicher Weise die Lösungen aus den Saamen wie aus den Keimlingen unterein-

ander verschieden und zwar in der Weise, dass sowohl von den aus den Saamen wie von den aus den Keimlingen gewonnenen Lösungen eine sich stärker gelblich gefärbt zeigte. Es empfahl sich daher, die stärker gefärbten und die farblosen für sich mit einander zu vergleichen.

Auch hier war das Resultat dasselbe wie bei den Linsen, nur noch prägnanter, indem bei den Saamen die Grünfärbung ziemlich stark auftrat, bei den Keimlingen dagegen von einer Grünfärbung nicht die Rede sein konnte, sondern hier einer Gelbfärbung Platz gemacht hatte.

Eine Bestätigung der Resultate von Schulze und Barbieri konnte ich also nicht erhalten. Wahrscheinlich ist eine dem Cholesterin nahe stehende Substanz, welche die Cholestol-Reaction nicht giebt, bei jenen Versuchen als Cholesterin mit gewogen worden.

Musste ich mich oben dahin aussprechen, dass Cholesterin keinenfalls als ein directes Spaltungsproduct des Eiweisses anzusehen sei, so ist dem nun noch hinzuzufügen, dass auch die Auffassung des Cholesterins als eines „bei dem allgemeinen Lebensprozesse der Zellen resultierenden Spaltungsproductes" (Hoppe-Seyler) mir nicht genügend begründet erscheint.

Zum Schluss sei es mir gestattet Herrn Professor Dr. O. Nasse für die freundliche Anregung und Unterstützung, die er mir bei dieser in dem Institut für Pharmakologie und physiologische Chemie ausgeführten Arbeit zu Theil werden liess, pflichtschuldigen Dank zu sagen.